



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number: 05034346

(43)Date of publication of application: 09.02.1993

(51)Int.Cl.

G01N 33/542

G01N 33/543

(21)Application number: 03221282

(71)Applicant:

TOSOH CORP

(22)Date of filing: 07.08.1991

(72)Inventor:

IKEDA KATAHITO

TOYODA KAZUHISA

SUZUKI HIDEO

(30)Priority

Priority number: 02242721 Priority date: 14.09.1990 Priority country: JP

(54) IMMUNOASSAY

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable shortening of an immunity measuring time and attainment of high sensitivity by a method wherein an antibody and a fluorescent substance are combined with one particulate, while a different antibody and a quenching substance are combined with the other, the particulates are brought into contact with a target substance of detection so that an immunoreaction product held by the two kinds of antibodies between be formed, and banishment of fluorescence is detected.

CONSTITUTION: A particulate A with which an antibody reacting specifically with a target substance of detection and a fluorescent substance are combined and a particulate B with which an antibody reacting specifically with the target substance of detection by a different antigen-determining group and a quenching substance are combined are brought into contact with the target substance of detection in a sample, so that an immunoreaction product wherein the target substance of detection is held by the antibodies on the A and the B between be formed. Banishment of fluorescence by the quenching substance is detected and the target substance of detection in the sample is measured therefrom. The two kinds of antibodies are so combined as to be connected with different antigen-determining groups respectively. For the particulates, colloids of various kinds are used and the combination with the antibodies and others is effected by physical adsorption, chemical combination or others. Since the fluorescent substance and the quenching substance are not combined with the

antibodies, but combined with the particulates, the amount of sible combination is increased sensitivity is made high.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending th examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998 Japanese Patent Office

[MENU](#)

[SEARCH](#)

[INDEX](#)

[DETAIL](#)

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-34346

(43)公開日 平成5年(1993)2月9日

(51)IntCl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/542	A	8310-2 J		
33/543	D	7906-2 J		
	E	7906-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数4(全 7 頁)

(21)出願番号 特願平3-221282

(22)出願日 平成3年(1991)8月7日

(31)優先権主張番号 特願平2-242721

(32)優先日 平2(1990)9月14日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000003300

東ソー株式会社

山口県新南陽市開成町4560番地

(72)発明者 池田 賢仁

神奈川県横浜市緑区たちばな台2-7-3

(72)発明者 豊田 和久

神奈川県藤沢市湘南台4-26-5

(72)発明者 鈴木 英夫

神奈川県大和市中央林間3-28-13

(54)【発明の名称】 免疫測定法

(57)【要約】

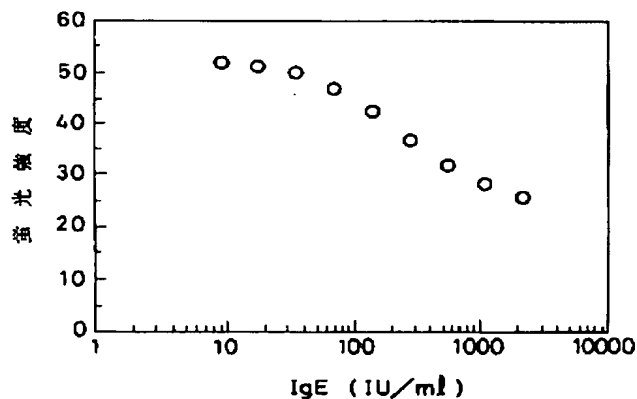
【目的】 B/F分離を必要としない均一法で、感度のよい免疫測定法を提供する。

【構成】 ・目的検出物質への抗体、及び蛍光物質を結合させた微粒子(A)

・目的検出物質の異なる抗原決定基への抗体、及び消光物質を結合させた微粒子(B)

のA、Bの微粒子を用いてサンドイッチ免疫測定を行い、消光物質による蛍光の消失を測定する。

【効果】 蛍光物質、消光物質が抗原抗体反応を妨害することなく、また、抗体を失活させる恐れがない。



【特許請求の範囲】

【請求項1】①・目的検出物質と特異的に反応する抗体、および蛍光物質を結合させた微粒子（A）

・相異なる抗原決定基で目的検出物質と特異的に反応する抗体、および消光物質を結合させた微粒子（B）を試料中の目的検出物質と接触させ、

②目的検出物質が（A）および（B）上の抗体によって挟み込まれた免疫反応生成物を形成させ、

③消光物質による蛍光の消失を検出することによって、試料中の目的検出物質を測定する事を特徴とする免疫測定法。 10

【請求項2】①・目的検出物質と特異的に反応する抗体、および蛍光物質、消光物質のどちらか一方を結合させた微粒子（A）

・蛍光物質、消光物質のもう一方を結合させた既知量の目的検出物質を試料中の目的検出物質と接触させ、

②試料中のおよび既知量の目的検出物質を、（A）上の抗体に競合的に結合させ、③目的検出物質と、（A）上の抗体とが結合した免疫反応生成物を形成させ、

④消光物質による蛍光の消失を検出することによって、試料中の目的検出物質を測定することを特徴とする免疫測定法。 20

【請求項3】・目的検出物質と特異的に反応する抗体、および蛍光物質を結合させた微粒子（A）

・相異なる抗原決定基で目的検出物質と特異的に反応する抗体、および消光物質を結合させた微粒子（B）からなる免疫測定用キット。

【請求項4】・目的検出物質と特異的に反応する抗体、および蛍光物質、消光物質のどちらか一方を結合させた微粒子（A） 30

・蛍光物質、消光物質のもう一方を結合させた既知量の目的検出物質からなる免疫測定用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は主として臨床検査における病原体、あるいは疾患マーカーなどの検出、さらには広く産業上の極微量検出などの免疫的検出分野に用いることのできる、免疫測定法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】天然に存在する、或いは人工的に作製した抗体を用いた免疫検出方法は、高特異性および高感度の点に特徴を有し、極微量の物質を検出する目的で利用されている。例えば、感染症、腫瘍、心筋梗塞または脳血栓などの疾病時に特異的に分泌されるいわゆる疾病マーカーを測定する臨床検査や大気中から極微量の物質を検出することなどに利用されている。 40

【0003】近年、例えば酵素免疫測定法（蛋白質核酸酵素 別冊 No. 31, 13-26頁 共立出版）に記載されているように、多くの種類の免疫測定法が開発されている。その中にあって、ラテックス凝集法は操作 50

の簡便さから古くから臨床検査に利用されてきた。しかしながら、現在では検査される極微量物質の種類も増えており、ラテックス凝集法では測定できないような高感度化を必要とする項目が増えてきている。

【0004】また、近年盛んに用いられている方法として放射線免疫測定（RIA）や酵素免疫測定法（EIA）などがあげられるが、RIAにおいてはその高感度な性能にもかかわらず測定時の人体に及ぼす影響が大きいことから敬遠され、標識物質としてラジオアイソトープよりもむしろ酵素反応を利用したEIAが利用されている一方では、検出システムの簡便さから、従来用いられてきた不均一法に変わって、B/F分離を必要としない均一法の開発が望まれている。Ullmanら（Methods in Enzymology vol. 74, 28（1981））は、サンドイッチ可能な抗体各々に蛍光物質または消光物質を化学結合させ、免疫反応に用いている。これは、抗原抗体反応によりサンドイッチが形成されたとき、抗体に結合した蛍光物質と消光物質が互いに近づくことにより、蛍光物質の蛍光エネルギーが消光物質の励起エネルギーにシフトし、結果としてその蛍光物質の蛍光強度が減少するという原理を用いた均一法である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】前項で記載したように、従来の免疫的検出方法はB/F分離など多くの工程を必要とし複雑であった。また、抗原抗体反応を固相と液相の共存する不均一系で行い、最終的な検出に酵素反応などを用いているため、測定に長時間を要していた。一方、Ullmanらの不均一系の方法では、標識物質として蛍光物質および消光物質の両方とも抗体に固定するため、抗体の性能を著しく阻害してしまう危険があり、高感度化に限界があった。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題に関し鋭意検討した結果、本発明に到達した。すなわち本発明は、①・目的検出物質と特異的に反応する抗体、および蛍光物質を結合させた微粒子（A）

・相異なる抗原決定基で目的検出物質と特異的に反応する抗体、および消光物質を結合させた微粒子（B）

を試料中の目的検出物質と接触させ、

②目的検出物質が（A）および（B）上の抗体によって挟み込まれた免疫反応生成物を形成させ、

③消光物質による蛍光の消失を検出することによって、試料中の目的検出物質を測定する事を特徴とする免疫測定法である。

【0007】また本発明は①・目的検出物質と特異的に反応する抗体、および蛍光物質、消光物質のどちらか一方を結合させた微粒子（A）

・蛍光物質、消光物質のもう一方を結合させた既知量の目的検出物質を試料中の目的検出物質と接触させ、

②試料中のおよび既知量の目的検出物質を、(A)上の抗体に競合的に結合させ、③目的検出物質と、(A)上の抗体とが結合した免疫反応生成物を形成させ、④消光物質による蛍光の消失を検出することによって、試料中の目的検出物質を測定することを特徴とする免疫測定法である。

【0008】さらに本発明は・目的検出物質と特異的に反応する抗体、および蛍光物質を結合させた微粒子 (A)

・相異なる抗原決定基で目的検出物質と特異的に反応する抗体、および消光物質を結合させた微粒子 (B) からなる免疫測定用キットである。

【0009】さらに本発明は・目的検出物質と特異的に反応する抗体、および蛍光物質、消光物質のどちらか一方を結合させた微粒子 (A) ・蛍光物質、消光物質のもう一方を結合させた既知量の目的検出物質からなる免疫測定用キットである。以下、本発明を詳細に説明する。

【0010】まず、第一の測定法の発明について説明する。本発明で用いられる抗体は、目的検出物質と特異的に反応するものであれば特に限定はなく、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれでもよい。由来とする動物も例えばマウス、ラット、羊、山羊、牛、馬などが用いられる。本発明では、このような抗体を2種類用いて、抗原を挟み込むように反応させるため、それらは相異なる抗原決定基に結合するよう組み合わせるべきである。この様な抗体の一方は微粒子 (A) に、他方は微粒子 (B) に結合させる。

【0011】微粒子は、その大きさが分子レベルよりも大きく、肉眼で見分けられるものよりも小さく、約10～5000オングストロームの粒径を持ち、各種のコロイドなどがこれに該当する。例えば、ラテックス、合成高分子などの高分子コロイド、プラチナ、金、銀などの貴金属コロイド、酸化アルミニウム、酸化チタンなどの無機酸化物コロイドなどがあげられる。これらの微粒子は、粒径が小さい方が蛍光物質と消光物質とが近づくことができるので好ましい。

【0012】微粒子と抗体との結合法は、通常免疫反応に用いられるような物理的吸着や化学的結合などが用いられる。

【0013】また、微粒子 (A) には蛍光物質を、微粒子 (B) には消光物質を結合させる。蛍光物質と消光物質としては、例えば、フルオレセインとテキサスレッド、ピレンブチレートと β -フィコエリスリン、フルオレセインと4', 5'-ジメトキシ-6-カルボキシフルオレセイン、フルオレセインとローダミンなどの組み合わせがあげられる。これらの蛍光物質、消光物質は、微粒子上に結合されるが、これは物理的吸着によって微粒子に直接結合させてもよいし、また他の物質、例えばBSAやPEGなどを微粒子に吸着させた後、それに共有結合させることで間接的に結合させてもよい。ただ

し、微粒子に直接結合させたほうが、調製の手間がかからず好ましい方法である。

【0014】以上のようにして得られた、蛍光物質、または消光物質と、抗体とが結合した微粒子 (A) ,

(B) を試料中の目的検出物質と接触させる。この時、接触の順序には特に限定はなく、(A) , (B) のどちらが先であっても、また同時であってもよい。

【0015】このようにして接触させることによって試料中の目的検出物質は、(A) および (B) 上の抗体によって挟み込まれ、免疫反応生成物が形成される。

(A) および (B) 上の蛍光物質、消光物質は、免疫反応が未反応の場合は距離が離れているため、互いに影響を及ぼさず、それぞれ固有のエネルギーをもっている。しかし免疫反応生成物が形成されると、非常に近い距離に蛍光物質と消光物質が置かれ、相互作用を及ぼし、消光物質による蛍光の消失が生じる。蛍光の消失は、免疫反応生成物の量に相関するため、その程度を測定することで試料中に含まれている目的物質が測定できる。

【0016】次に第2の測定法の発明について説明する。

【0017】第2の発明でも第1の発明と同様の抗体、微粒子、蛍光物質、消光物質が用いられる。また抗体、蛍光物質、消光物質の微粒子への結合も、同様の方法が用いられる。本発明で用いられる微粒子は、目的検出物質と特異的に反応する抗体、および蛍光物質、消光物質のどちらか一方を結合させた微粒子 (A) の一種類だけである。

【0018】(A) 上には、蛍光物質、消光物質どちらを結合させてもよいが、消光物質を結合させるほうが好ましい。それは、目的検出物質上に結合させるよりも多くの標識物質を微粒子上に結合させることができ、効率よく消光が起こり、感度が向上するためである。

【0019】また既知量の目的検出物質に蛍光物質、消光物質のもう一方を結合させる。その方法としては、直接的に結合させても、また粒子、高分子などを介して間接的に結合させてもよい。

【0020】以上のような抗体、および蛍光物質、消光物質の一方を結合させた (A) 、蛍光物質、消光物質のもう一方を結合させた既知量の目的検出物質を、試料中の目的検出物質と接触させ、競合的に反応を行わせる。その結果、目的検出物質と (A) 上の抗体とが結合した免疫反応生成物が形成される。(A) 上および既知量の目的検出物質上の蛍光物質、消光物質は、免疫反応が未反応の場合は、距離が離れているため、互いに影響を及ぼさず、それぞれ固有のエネルギーをもっている。しかし、免疫反応生成物が形成されると、非常に近い距離に蛍光物質と消光物質が置かれ、相互作用を及ぼし、エネルギー状態が変化し、消光物質による蛍光の消失が生じる。蛍光の消失は免疫反応生成物の量に相関するため、その程度を測定することにより試料中に含まれる目的検

出物質が測定できる。

【0021】さらに本発明は、上記2つの測定に用いられるキットを提供するものである。第1の発明に用いられるキットは、

- ・目的検出物質と特異的に反応する抗体、および蛍光物質を結合させた微粒子（A）
 - ・相異なる抗原決定基で目的検出物質と特異的に反応する抗体、および消光物質を結合させた微粒子（B）
- とからなる。

【0022】また第2の発明に用いられるキットは、

- ・目的検出物質と特異的に反応する抗体、および蛍光物質、消光物質のどちらか一方を結合させた微粒子（A）
 - ・蛍光物質、消光物質のもう一方を結合させた既知量の目的検出物質
- とからなる。

【0023】これらのキットを構成する各成分は、前記の測定法のところで述べたものと同様である。この他に例えば、希釈剤、安定剤など測定に悪影響を与えない試薬を含んでいてもよい。

【0024】

【実施例】本発明を以下の実施例にて詳細に説明する。しかし本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

（実施例1）

合成法

蛍光物質としてフルオレセインを、消光物質としてローダミンをそれぞれ結合させたポリスチレンラテックスAおよびBに対して、異なった部位を認識する2種類の抗IgEモノクローナル抗体をそれぞれ固定化した。すなわち、スチレンモノマー100gを水500gに溶かし、SDS10gを加え攪拌し、加熱して約60℃で過硫酸カリウム0.4g/100ml水を加え、重合を開始し、3時間攪拌した後、冷却し、反応を停止させた。得られたラテックス溶液を純水にて1日透析した。このようにして合成されたポリスチレンラテックス1%溶液10mlにフルオレセイン又はローダミンを200mg入れ、30分間超音波分散装置で処理した。その後、得られた溶液を1日純水で透析した。この様にしてフルオレセイン又はローダミンが結合したポリスチレンラテックスが得られた。

【0025】次に0.1Mの重炭酸ナトリウム、0.15Mの塩化ナトリウム、0.08%のアジ化ナトリウム（pH8.5）を含んだ緩衝液500μlと前法によって合成されたフルオレセイン結合ポリスチレンラテックス（100倍水希釈）500μlを混ぜ、さらに純水を4ml加えた。その後、40μlの抗IgEモノクローナル抗体（抗体濃度10mg/ml）を加え、攪拌した。さらにポリスチレンラテックスに、5mlの10%ポリエチレングリコール（分子量：20000）を加え、1時間放置してブロッキングした。このようにして

抗体およびフルオレセイン結合ポリスチレンラテックスが得られた。ローダミン結合ポリスチレンラテックスおよび異なった部位を認識する抗IgEモノクローナル抗体を用いて同様に反応を行い、抗体およびローダミン結合ポリスチレンラテックスを得た。

検出法

上記のようにして得られた蛍光物質および抗体結合ラテックス溶液と、消光物質および抗体結合ラテックス溶液をそれぞれ50μlに、サンプルとしてIgE抗原10~2200IU/mlを含む標準血清を900μl加え、10分間インキュベーションした。その後、蛍光分光光度計で励起波長495nm（バンドパス5nm）、蛍光波長515nm（バンドパス5nm）で、蛍光強度を測定した。結果を図1に示す。図からも明らかなように、抗原量の増加に伴って蛍光強度の減少が確認され、蛍光強度の減少度からIgE抗原濃度を検出することができた。

（実施例2）

合成法

- 20 あらかじめ、異なった部位を認識する2種類の抗FISHモノクローナル抗体をそれぞれ固定したポリスチレンラテックスに、蛍光物質としてフルオレセインイソチオシアネートをBSAに結合させたもの、消光物質としてローダミンイソチオシアネートをBSAに結合させたものをそれぞれ固定化した。すなわち、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）20mgを100mgのBSA含有100mlPBSバッファーに入れ、24時間攪拌した後、24時間透析を行い、FITC固定化BSAを得た。一方、ローダミンイソチオシアネート（TMRITC）20mgを100mgのBSA含有100mlPBSバッファーに入れ、24時間攪拌した後、24時間透析を行い、TMRITC固定化BSAを得た。

- 30 【0026】0.1Mの重炭酸ナトリウム、0.15Mの塩化ナトリウム、0.08%のアジ化ナトリウム（pH8.5）を含んだ緩衝液500μlと実施例1と同様に合成されたポリスチレンラテックス1%溶液500μlを混ぜ、さらに純水4ml加えた。その後、抗FISHモノクローナル抗体（抗体濃度0.1mg/ml）50μl加え、攪拌した。さらに前記したFITC固定化BSAを50μl加え、1時間放置してブロッキングし、FITCおよび抗体固定化ラテックスを得た。

- 40 【0027】相異なる部位を認識する抗FISHモノクローナル抗体およびTMRITC固定化BSAを用いて同様に処理し、TMRITCおよび抗体固定化ラテックスを得た。

検出法

上記のようにして得られたFITC及び抗体固定化ラテックス溶液、及びTMRITC及び抗体固定化ラテックス溶液をそれぞれ50μlに、サンプルとしてFISH抗原1~1000mIU/mlを含む標準血清を900μ

1 加え、10 分間インキュベーションした。その後、蛍光分光光度計で励起波長 495 nm (バンドパス 5 nm)、蛍光波長 515 nm (バンドパス 5 nm) で、蛍光強度を測定した。結果を図 2 に示す。図からも明らかなように、抗原量の増加に伴って蛍光強度の減少が確認され、蛍光強度の減少度から FSH 抗原濃度を検出することができた。

(実施例 3)

合成法

あらかじめ、異なった部位を認識する 2 種類の抗 FSH モノクローナル抗体をそれぞれ固定した白金微粒子に、蛍光物質としてフルオレセインイソチオシアネートを BSA に結合させたもの、又は消光物質としてローダミンイソチオシアネートを BSA に結合させたものをそれぞれ固定化した。

【0028】すなわち、実施例 2 と同様にして FITC 固定化 BSA 及び TMRITC 固定化 BSA を得た。

【0029】0.1M の重炭酸ナトリウム、0.15M の塩化ナトリウム、0.08% のアジ化ナトリウム (pH 8.5) を含んだ緩衝液 500 μ l と常法 (貴金属元素の化学と応用 60~71 頁 講談社) により合成された白金微粒子原液 500 μ l を混ぜ、さらに純水 4 ml 加えた。その後、抗 FSH モノクローナル抗体 50 μ l (抗体濃度 0.1 mg/ml) を加え、攪拌した。さらに前記した FITC 固定化 BSA を 50 μ l 加え、1 時間放置し、FITC 及び抗体固定化白金微粒子を得た。相異なる部位を認識する抗 FSH モノクローナル抗体及び TMRITC 固定化 BSA を用いて同様に処理し、TMRITC 及び抗体固定化白金微粒子を得た。

検出法

上記のようにして得られた FITC 及び抗体固定化白金微粒子溶液、及び TMRITC 及び抗体固定化白金微粒子溶液をそれぞれ 50 μ l に、サンプルとして FSH 抗原 1~1000 mIU/ml を含む標準血清を 900 μ l 加え、10 分間インキュベーションした。その後、蛍光分光光度計で励起波長 495 nm (バンドパス 5 nm)、蛍光波長 515 nm (バンドパス 5 nm) で、蛍光強度を測定した。結果を図 3 に示す。結果からも明らかなように、抗原量の増加にともなって蛍光強度の減少が確認され、蛍光強度の減少度から FSH 抗原濃度を検出することができた。

(実施例 4)

合成法

実施例 3 と同様にして、TMRITC 又は FITC と、相異なる抗原部位を認識する抗 FSH モノクローナル抗体とを固定化した白金微粒子を得た。

測定法

実施例 3 と同様にして、ただしサンプルとして FSH 抗原を 387.5 mIU/ml, 775 mIU/ml 又は 1550 mIU/ml 含む標準血清を用い、それぞれイ

ンキュベーション時間を 0.5 分、2 分、5 分、10 分、20 分、30 分、40 分としたときの反応の進行具合を比較した。結果を図 4 に示す。横軸は、インキュベーション時間を示し、縦軸はインキュベーション 0.5 分のときの蛍光強度を 100 としたときの、それぞれ相対的な蛍光強度を示す。図からも明らかなように、インキュベーション時間が短くても、十分に反応が進行しており、このため、検出に要する時間は著しく短くできることがわかった。

(実施例 5)

合成法

抗アビジン抗体を固定化したラテックスに、消光物質として TMRITC を BSA に結合させたものを固定化した。すなわち、積水化学工業社製試薬用ラテックス 1/100 希釈したもの 100 μ l (粒子径 0.525 μ m、固型分 10%) を 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 4.9 ml 中に加え、さらに抗アビジン抗体 (EY Laboratory 社製、7.5 mg/ml) を 50 μ l 加え、ラテックス粒子に結合させた。

【0030】抗体固定化ラテックス粒子に、実施例 2 と同様にして得た TMRITC 固定化 BSA 50 μ l 加え、2 時間反応させた後、500 μ l の 10% ポリエチレングリコール (分子量 20000) を加え、1 時間ブロッキングした。このようにして抗体及び TMRITC 固定化ラテックスを得た。

検出法

アビジン (ナカライテスク社製、0.1 μ g/ml ~ 1000 μ g/ml) 50 μ l と、FITC 標識化アビジン (カッセル社製、0.0259 mg/ml) 50 μ l、抗体及び TMRITC 固定化ラテックス 100 μ l を蛍光測定用マイクロタイタープレートに加えた。0.5~60 分インキュベーション後、マイクロタイター蛍光リーダーで、励起波長 495 nm (バンドパス 5 nm)、蛍光波長 515 nm (バンドパス 5 nm) で蛍光強度を測定した。結果を図 5 に示す。図からも明らかなように、抗原量の増加にともなって、蛍光強度が増加し、この増加度からアビジン濃度を検出することができた。

(実施例 6)

合成法

抗アビジン抗体を固定化した白金超微粒子に、消光物質として TMRITC を BSA に結合させた物を固定化した。すなわち、960 ml の水 (100℃) 中に 1 wt % クエン酸 (和光純薬工業社製) 120 ml と、塩化白金酸 ($H_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$ 、和光純薬工業社製) 60 ml を加えて 3 時間還流、攪拌した。氷浴で冷却後、イオン交換カラム (Amberlite MB-1) を通した。カラム通過後の電気電導度が 5 μ S/cm) 以下であることを確認した。

【0031】こうして得た白金超微粒子原液 1 ml に、

9

0.1Mトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) 4.0ml 加え、さらに抗アビジン抗体 (7.5mg/ml) を50 μ l 加え、白金粒子に固定化させた。抗体固定化白金粒子に、実施例2と同様にして得たTMRITC固定化BSA50 μ l 加え、2時間反応させた後、500 μ l の10%ポリエチレングリコール (分子量20000) を加え、1時間ブロッキングした。この様にして、抗体及びTMRITC固定化白金粒子を得た。

検出法

実施例5と同様にして、ただし抗体及びTMRITC固定化ラテックスのかわりに抗体及びTMRITC固定化白金粒子を用いて測定を行った。結果を図5に示す。図からも明らかなように、抗原量の増加にともなう、蛍光強度が増加し、この増加からアビジン濃度を検出することができた。

【0032】

【発明の効果】本発明によれば、抗体にではなく、微粒子に蛍光物質、消光物質を結合させる。したがって、①蛍光物質、消光物質の結合量を著しく増大させることができ、このため高感度検出が可能となった。

10

②蛍光物質、消光物質が抗原抗体反応を妨害することがなく、抗体を失活させる恐れがなくなった。

【0033】また本発明では、反応が均一系、すなわち液相で行われるため、従来、固-液系で行われてきた複雑なB/F分離などの操作を必要としなくなった。さらに従来約1時間を要していた免疫測定を、著しく短縮することができる。

【0034】また本発明の測定用キットを用いれば、本発明の測定法を簡便に行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1のIgE抗原濃度に対するフルオレセインの蛍光強度の変化を示す図である。

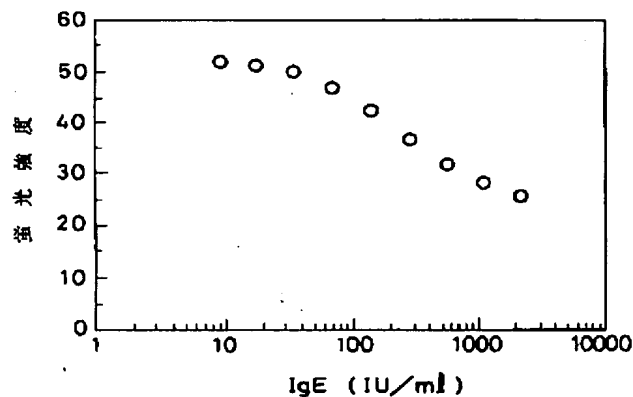
【図2】実施例2のFSH抗原濃度に対するフルオレセインの蛍光強度の変化を示す図である。

【図3】実施例3のFSH抗原濃度に対するフルオレセインの蛍光強度の変化を示す図である。

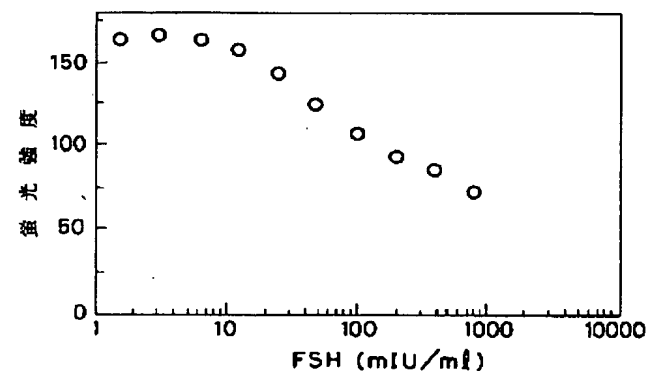
【図4】実施例4のインキュベーション時間に対する相対的な蛍光強度を示す図である。

20 【図5】実施例5及び6のアビジン抗原濃度に対するフルオレセインの蛍光強度の変化を示す図である。

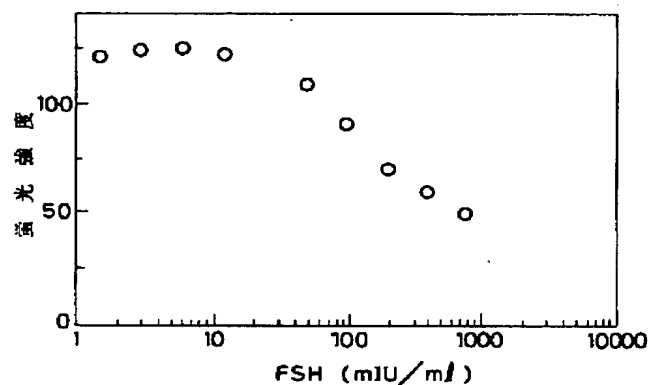
【図1】



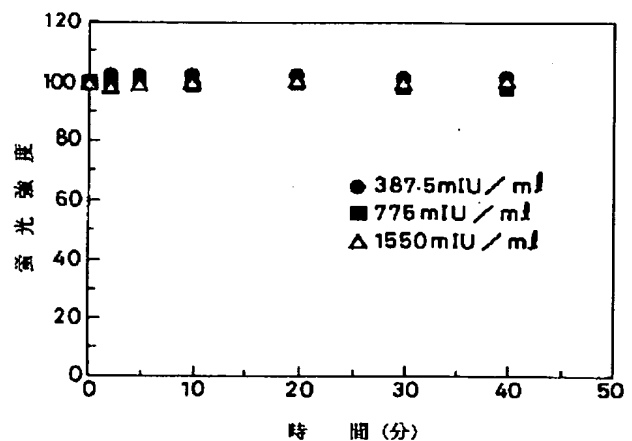
【図3】



【図2】



【図4】



【図5】

